



共焦点顕微鏡FV3000を用いたマルチプレキシング

マウス内側前頭前皮質の微細構造の解明

認知機能障害メカニズムの研究には、形態学的変化と生理学的反応の関連付けが必要です。また、疾患の程度や治療による脳の形態学的変化を理解するためには、同一サンプルにおける複数の形態学的構造を特定することが重要です。本研究では、TruSpectral分光検出器を搭載したFV3000を用いて、マウスの内側前頭前皮質（mPFC）におけるアストロサイト、錐体ニューロン、抑制性ニューロン、ニューロン細胞膜、軸索起始部および核の6種類の異なる構造の撮影に成功しました。

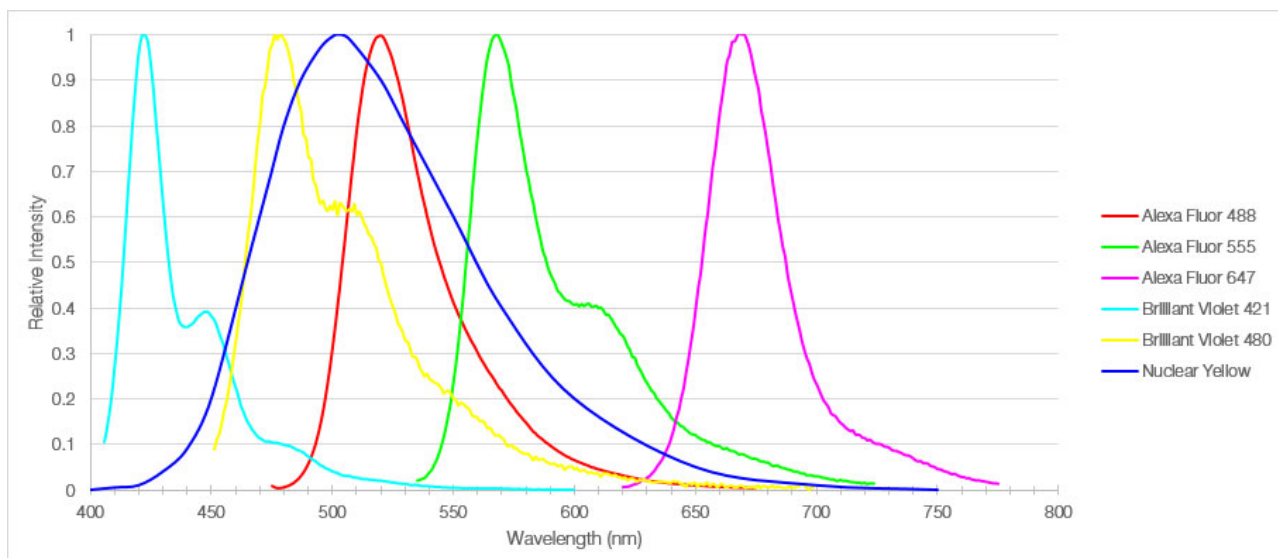


図1：マウス内側前頭前皮質切片のラベルに用いた6種類の蛍光色素の蛍光スペクトル

TruSpectralにより6種類の構造を明確に区別

本実験では、厚さ30 μ mのマウスmPFCの固定化切片を6種類の蛍光色素でラベルし、UPLSAPO20X対物レンズを搭載した共焦点顕微鏡FV3000を用いて、脳組織の3Dマルチカラー画像を撮影しました。TruSpectral分光検出器を用いてシグナル検出を最適化し、チャンネル間における蛍光のクロストークを最小にするために、蛍光色素ごとに検出パラメーターを設定しました。その結果、蛍光色素ごとに明るい画像を得ることができ、同一サンプル内で複数の構造を正確に確認することができました。

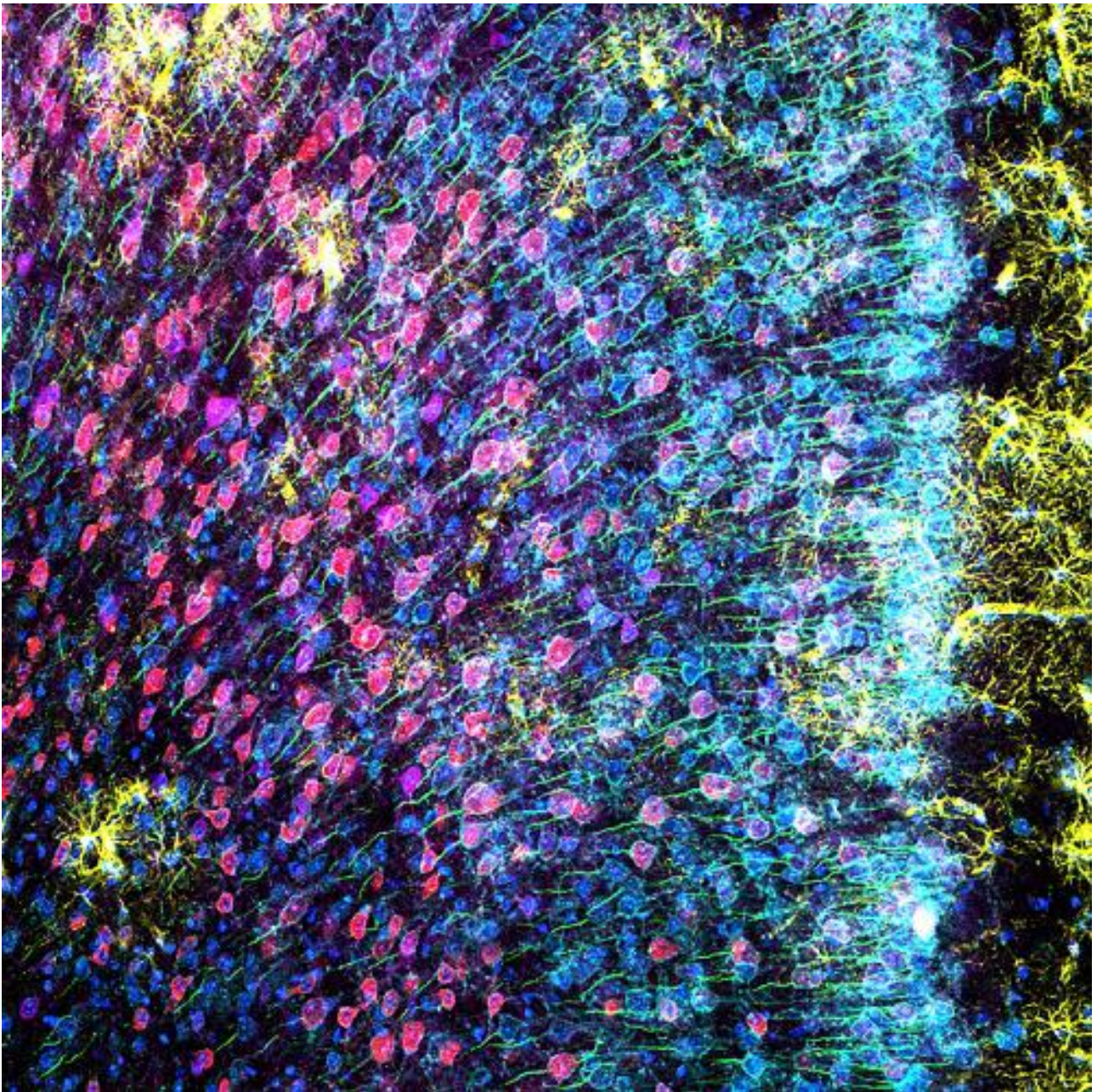


図2 : Mouse mPFC labeled with glial fibrillary acidic protein (GFAP; astrocyte marker; yellow), calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII; pyramidal neuron marker; red), amphoterin-induced protein 1 precursor (AMIGO-1; neuronal membrane marker; cyan), parvalbumin (PV; inhibitory neuron marker; purple), ankyrin-G (AnkG; axon initial segment marker; green), and nuclear yellow (nuclei marker; blue).

撮影条件

対物レンズ : 20倍ドライ対物レンズ (UPLSAPO20X)

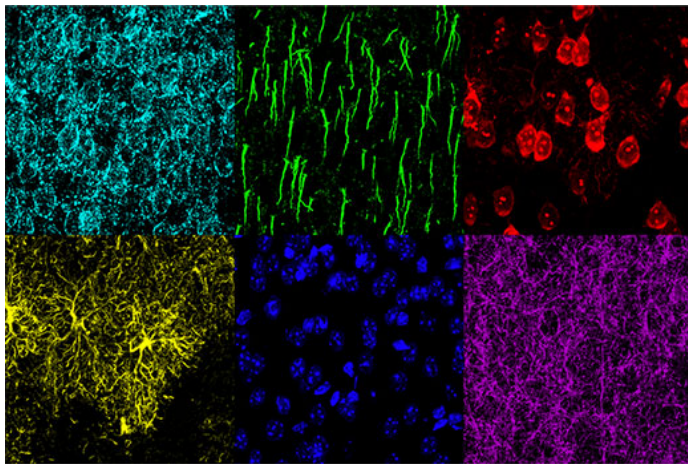
顕微鏡 : FLUOVIEW FV3000 (virtual channel mode)

レーザー : 405nm (BV421、Nuclear Yellow) 、 445nm (BV480) 、 488nm (AF488) 、 561nm (AF555) および640nm (AF647)

100倍シリコンオイル浸対物レンズによる形態構造の高解像画像の取得

マウスmPFCの高解像度画像を得るために、100倍シリコンオイル浸対物レンズおよびTruSpectral高感度分光検出器を使用しました。その結果、6種類のマーカーでラベルされた皮質部分をより明るく高精細に撮影することができました。100倍シリコンオイル浸対物レンズとTruSpectral高感度分光検出器を組み合わせることで、mPFC内のさまざまな種類のニューロンの形態を明瞭に観察することができました。

(A)



(B)

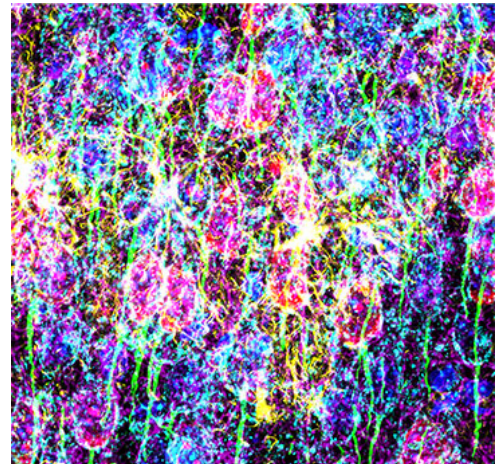


図3： Mouse mPFC labeled with glial fibrillary acidic protein (GFAP; astrocyte marker; yellow), calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII; pyramidal neuron marker; red), amphoterin-induced protein 1 precursor (AMIGO-1; neuronal membrane marker; cyan), parvalbumin (PV; inhibitory neuron marker; purple), ankyrin-G (AnkG; axon initial segment marker; green), and nuclear yellow (nuclei marker; blue). (A) Individual channels of the six fluorophores. (B) Overlay image.

撮影条件

対物レンズ：シリコンオイル浸対物レンズ（UPLSAPO100XS）

顕微鏡：FLUOVIEW FV3000 (virtual channel mode)

レーザー：405nm (BV421、Nuclear Yellow)、445nm (BV480)、488nm (AF488)、561nm (AF555) および640nm (AF647)

実験を可能にしたFV3000の技術

高効率GaAsP分光検出器で高感度のマルチカラー画像取得が可能

シリコンオイル浸対物レンズUPLSAPO100XSを用いて厚みのある組織切片の明るい画像取得を実現

スーパーアポクロマート対物レンズUPLSAPOは、球面収差や色収差を補正し、可視から近赤外領域において高い透過率特性を持っています。シリコンオイルの屈折率（ n_e 約1.40）は生組織の屈折率（ n_e 約1.38）とほぼ同じであるため、屈折率の差によって生じる球面収差の影響を受けにくく、生組織の3D構造を高解像度で正確に撮影することができます。



倍率：100×

NA：1.35（シリコンオイル浸）

W.D.：0.2 mm

色収差補正レベル：スーパーアポクロマート（SAPO）

Stephanie Shiers氏からのコメント



私達は、神経障害性疼痛におけるmPFC-依存性認知機能障害の研究を行っています。そして、大脳皮質機能障害に関わる細胞とそれらの機能変化を解明するために、mPFCの構造的可塑性についての検討を進めており、認知作業能低下と関係する神経障害性疼痛を有する雄マウスの軸索起始部の長さの変化の調査に取り組んできました（Shiers, et al. J Neurosci 2018, Shiers, et al. Neuropsychopharmacology, 201）。細胞の形態学的側面を調べることは、神経障害性疼痛における認知機能障害の原因や治療方法の手がかりを得るために重要ですが、mPFCの微細構造分析に際しては、FV3000を用いて得られる高解像画像が大変有効でした。

Dr. Theodore Priceからのコメント



我々の研究の主な目的は、認知過程に深く関わっている脳の構造に対して、神経障害性疼痛がどのような影響を及ぼしているかを理解することです。認知機能異常が神経障害性疼痛の重要な共存疾患であることはわかっていますが、分子レベルではほとんど何もわかっていません。本研究では、マウスPFCにおいて神経障害性疼痛が引き起こす軸索起始部の微細な変化について検討しましたが、FV3000を用いることで、PFCの超微細構造の高品質画像を得ることができました。これは、神経障害性疼痛の重要な側面を理解するための画期的な手法です。

アプリケーションノート制作にご協力賜りました先生：

Stephanie Shiers, Ph.D. Candidate, Price Lab, University of Texas at Dallas

Theodore J. Price, Ph.D., Price Lab, Eugene McDermott Professor, Director,

Center for Advanced Pain Studies, Department of Neurobiology, School of Behavioral and Brain Sciences, University of Texas at Dallas

Related Products



共焦点レーザー走査型顕微鏡

FV4000

- 革新的なダイナミックレンジで個体/組織レベルから細胞内微小構造のレベルまでマルチスケールのイメージング
- TruSpectral分光検出器による、最大6CHのマルチプレックスイメージング
- 固定細胞/生細胞のイメージングのために改良された高速・高解像スキャナー
- より深部まで、高感度でイメージングが可能な先駆的NIR蛍光イメージング
- SiVIRディテクター™により信頼性が高く、再現性が高い画像データを安心して取得
- 405nmから785nmにわたり業界最大*の最大10本のレーザーを搭載可能

*2023年10月時点、当社調べによる。

Learn More ▶ <https://www.olympus-lifescience.com/laser-scanning/fv4000/>

スーパーアポクロマート対物レンズ



UPLSAPOシリーズ

- 可視から近赤外域までの球面収差、色収差を徹底補正したスーパーアポクロマート対物レンズでUVから近赤外域までの高い透過率を追求。
- 世界最高レベルの蛍光性能を発揮し、明視野、DIC観察においてもクリアで色ズレのない観察を実現。
- シリコン浸対物レンズシリーズは、細胞の深部まで、明るく解像力高く観察することが可能。

Learn More ▶ <https://www.olympus-lifescience.com/objectives/uplsapo-c/>



スーパーアポクロマート対物レンズ

UPLSAPO-S/UPLSAPO-Wシリーズ

- 可視から近赤外域までの球面収差、色収差を補正したスーパーアポクロマート対物レンズでUVから近赤外域までの高い透過率を実現。
- 生体細胞の屈折率に近い浸液を使用するシリコーン浸、水浸対物レンズをラインアップし、ライブイメージングで効果を発揮。

Learn More ▶ <https://www.olympus-lifescience.com/objectives/uplsapo/>